

## Media Alternatif untuk Pertumbuhan Sel Midgut *Spodoptera litura*

Muhammad Ma'ruf Aljauhari, Mahanani Tri Asri, Guntur Trimulyono

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

### ABSTRAK

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup dikembangbiakkan dalam suatu media secara *in vitro*. Kultur sel midgut *S. litura* dapat digunakan sebagai inang untuk virus *Spodoptera litura* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus (SplMNPV) yang berperan dalam pengendalian *S. litura*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pertambahan jumlah sel midgut *S. litura* dan lama waktu inkubasi sel midgut *S. litura* pada media RPMI 1640, DMEM, dan media campuran RPMI 1640 dan DMEM sebagai media alternatif dengan inokulum awal  $4,0 \times 10^5$  sel/ml. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali pengulangan sehingga terdapat 12 unit perlakuan. Data dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*). Uji lanjutan dengan BNT (Beda Nyata Terkecil). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertambahan jumlah sel midgut *S. litura* tertinggi diperoleh pada media Grace's (kontrol) sebanyak 23.125 kali inokulum awal, media campuran RPMI dan DMEM sebanyak 21.950 kali inokulum awal, RPMI 1640 sebanyak 11.725 kali inokulum awal serta DMEM sebanyak 10.400 kali inokulum awal. Sel midgut *S. litura* pada media Grace's (kontrol), DMEM serta media media campuran RPMI 1640 dan DMEM membentuk monolayer pada masa inkubasi 24 jam, sedangkan pada media RPMI 1640 sel midgut *S. litura* membentuk monolayer pada masa inkubasi 48 jam. Berdasarkan hasil penelitian media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos merupakan media alternatif yang paling optimal dalam mendukung pertumbuhan sel midgut *S. litura*

**Kata kunci:** *Spodoptera litura*; sel midgut; kultur sel

### ABSTRACT

Cell culture is process when viable cell propagated *in vitro* in the medium. Midgut cell culture of *S. litura* is very useful as hosts for SplMNPV virus that can control *S. litura*. This study aimed to determine the increase in the number of *S. litura* midgut cells and long incubation time of *S. litura* midgut cells in RPMI 1640, DMEM, and mixture of RPMI 1640 medium and DMEM as alternative medium with initial inoculum  $4.0 \times 10^5$  cell/ml. This research used Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatments and 3 repetitions so that there are 12 treatment unit. Data was analyzed using ANOVA (*Analysis of Variance*). Further tests are LSD (Least Significant Difference). The results showed that the highest increase of the number of *S. litura* midgut cells was obtained in Grace's medium (control) with 23125 times inoculum, the mixture of RPMI 1640 and DMEM medium was 21950 times inoculum, RPMI 1640 medium was 11725 times, DMEM medium was 10400 times inoculum. *Spodoptera litura* midgut cells form a monolayer in a 24-hour incubation in Grace's medium, the mixture of RPMI 1640 and DMEM medium, and DMEM, whereas the monolayer formation in RPMI 1640 medium is in a 48-hour incubation. The result showed that the mixture of RPMI 1640 and DMEM medium is an optimum alternative medium that support the growth of *Spodoptera litura* midgut cell.

**Key words:** *Spodoptera litura*; midgut cell; cell culture

### PENDAHULUAN

Kultur sel merupakan suatu proses saat sel hidup ditempatkan ke dalam suatu media yang dapat membuat sel tersebut berkembang biak atau tumbuh secara *in vitro* (Ma'at, 2011). Media kultur buatan yang digunakan untuk menumbuhkan sel di luar tubuh organisme dibuat semirip mungkin dengan cairan biologis pada saat sel berada dalam tubuh organisme (Echalier, 1997). Kultur sel dapat berupa kultur sel primer maupun *cell line*. Kultur sel primer

merupakan kultur yang dimulai dari sel, jaringan, organ yang diperoleh langsung dari organisme asalnya (Ma'at, 2011), sedangkan *cell line* ialah kultur yang diperoleh dari subkultur pertama dari kultur primer (Ma'at, 2011). Kultur sel primer memiliki beberapa kelemahan di antaranya kebutuhan hewan percobaan sebagai bahan baku kultur yang besar dan kemungkinan besar adanya kontaminasi virus atau mikroba yang dapat menginfeksi hewan percobaan yang akan digunakan sebagai stok kultur (Ma'at, 2011).

Metode dalam kultur sel terdiri atas kultur monolayer dan kultur suspensi. Metode kultur monolayer digunakan jika sel yang akan dikultur merupakan sel yang melekat, sedangkan metode kultur suspensi digunakan untuk sel yang tidak melekat (Ma'at, 2011). Kultur sel menjadi penting karena kemampuan organisme eukariot untuk menghasilkan protein komersial secara *in vivo* lebih rendah dibandingkan bakteri yang mudah dikembangkan dalam media buatan. Pengembangan metode dilakukan untuk meningkatkan hasil produk protein komersial dari organisme eukariot melalui teknik kultur secara *in vitro*, yaitu dengan teknik kultur jaringan/kultur sel (Goosen *et al.*, 1993). Kultur sel insekta sangat bermanfaat untuk mengembangkan vektor atau sel pembawa yang berfungsi sebagai inang bagi Baculovirus termasuk *Spodoptera litura* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus (*SpltMNPV*) karena virus tidak dapat dibiakkan pada media buatan seperti halnya mikroba lain. Kultur sel insekta juga dapat mengekspresikan beberapa gen asing dari eukariot yang diinsersikan pada sel yang akan dikultur atau pada mikroba perantara seperti virus (Lynn, 2006). Sel rekombinan tersebut dikembangkan pada media kultur dan mengekspresikan gen asing sehingga di dalam kultur tersebut akan terkumpul protein hasil ekspresi sel rekombinan (Lynn, 2006).

Sistem kultur sel insekta menarik untuk diaplikasikan dalam skala besar karena kultur sel ini tidak dibatasi hanya untuk menumbuhkan Baculovirus seperti *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (*AcNPV*) atau *SpltMNPV* (Khususnya dari golongan Lepidoptera) saja, tetapi dapat juga untuk menumbuhkan virus penyebab penyakit manusia (demam berdarah) yang mempunyai vektor nyamuk golongan Diptera (Echalier, 1997). Kultur sel insekta telah dilakukan oleh Asri dkk. (2007), yaitu kultur sel midgut instar 1 sampai dengan instar 6 dengan menggunakan media Grace's. Kultur primer sel epitel usus *Spodoptera litura* memiliki pertumbuhan yang optimal yaitu pada larva instar 5. Midgut atau usus tengah ialah bagian dari sistem pencernaan serangga yang menjadi tempat masuknya bakteri, virus, dan toksin seperti halnya makanan dan air (Hakim *et al.*, 2010).

Prinsip umum maupun metode yang digunakan dalam kultur sel invertebrata, relatif sama dengan prinsip maupun metode kultur yang digunakan dalam kultur sel vertebrata (Vlak *et al.*, 1996). Sel insekta kebanyakan dikultur pada media yang khusus diformulasikan untuk insekta,

tetapi sel insekta dapat diadaptasikan pada media vertebrata, contohnya *Schneider's S2 line* yang merupakan *cell line* yang berasal dari *Drosophilla* sp dapat tumbuh pada media Eagle's yang merupakan media untuk kultur vertebrata (Echalier, 1997). Salah satu variasi dari media Eagle's yaitu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yang mengandung vitamin dan asam amino 4 kali lebih besar dan mengandung 2-4 kali lebih banyak glukosa dari medium Eagle's (Ma'at, 2011). Media *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) memiliki konsentrasi asam amino 2 kali lebih tinggi dari media Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Mather dan Roberts, 1998). Media Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) merupakan media yang banyak digunakan untuk kultur vertebrata, media RPMI 1640 memiliki variasi jumlah asam amino yang hampir sama dengan Grace's, tetapi memiliki konsentrasi asam amino yang lebih kecil dibanding Grace's (Mather dan Roberts, 1998).

Lenk *et al.* (2006), telah berhasil mengkultur *cell line* (sf9 dan Sf21) dari *Spodoptera frugiperda* sebagai inang untuk Baculovirus maupun penghasil protein. *Cell line* Sf9 dan Sf21 diadaptasikan terlebih dahulu dalam media TNM-FH +10% FBS dengan metode monolayer. *Cell line* yang telah diadaptasikan dengan metode suspensi, ditanam dalam media serum dan media bebas serum dengan inokulum awal  $4,0 \times 10^5$  sel/ml. Produksi virus dan protein antara media berserum dan media bebas serum relatif sama. Penelitian yang dilakukan Lynn (2006) juga membandingkan antara media berserum dan media bebas serum, yaitu media TC-100 dan Excell 400. Pengamatan pertumbuhan dilakukan selama 7 hari pada interval pengamatan 24 jam. Fase *Plateau* terjadi pada 7 hari pengamatan dan didapatkan hasil densitas yang relatif sama.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan media alternatif untuk pertumbuhan kultur sel midgut *S. litura*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) dan dilaksanakan pada Januari 2013. Alat-alat yang diperlukan ialah spuit ukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml, cawan Petri, aluminium foil, mikropipet, autoklaf, haemocytometer, mikroskop inverted, laminar air flow, pembakar spiritus, cawan kultur, membran Millipore 0,22  $\mu$ , inkubator tanpa CO<sub>2</sub>, botol media, kamera digital, gunting plastik, dan kertas label. Bahan

yang diperlukan ialah media-media untuk pertumbuhan sel meliputi Grace's (kontrol), RPMI 1640, DMEM, dan media campuran RPMI 1640 dan DMEM, kultur sel epitel dalam media Grace's, tissue, akuades, antibiotik penisilin, antibiotik streptomisin, antibiotik gentamisin sulfate, Amphoterasin B Sulphate, larutan *Phospat Buffer Solution* (PBS), agen pensteril seperti alkohol 70%, bayclin.

Penelitian ini menggunakan empat perlakuan, yaitu media Grace's, DMEM, RPMI 1640 serta media campuran DMEM dan RPMI 1640 dengan tiga pengulangan. Media yang digunakan yaitu Grace's (kontrol), RPMI 1640, DMEM serta campuran antara RPMI 1640 dan DMEM dengan inokulum awal  $4,0 \times 10^5$  sel/ml. Perlakuan dengan berbagai media ialah sebagai berikut: mengambil masing-masing media sebanyak 3 ml dan dimasukkan ke cawan kultur

ukuran diameter 35 mm. Sel midgut *Spodoptera litura* dihitung dengan *haemocytometer*. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi sel sebesar  $4,0 \times 10^5$  sel/ml. Sel midgut *Spodoptera litura* ditumbuhkan pada cawan kultur yang telah berisi masing-masing media. Penghitungan pertambahan jumlah sel maupun pengamatan sel dilakukan setiap hari selama 7 hari dengan interval pengamatan 24 jam.

## HASIL

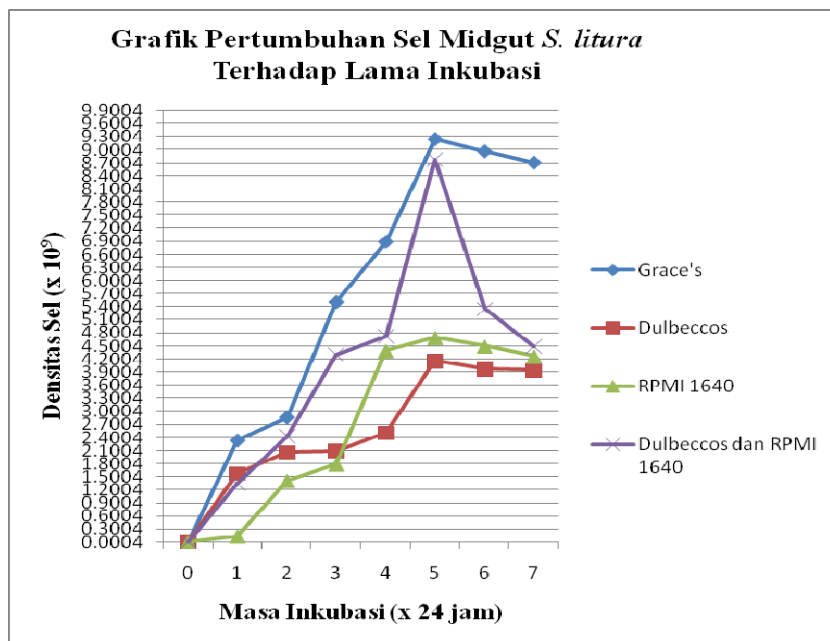
Pertumbuhan sel midgut *S. litura* dapat dilihat dari pertambahan jumlah sel midgut *S. litura* (Tabel 1).

Pertumbuhan sel di dalam suatu kultur akan mengikuti suatu kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan sel midgut *S. litura* dapat dilihat pada Gambar 1.

**Tabel 1.** Rerata pertumbuhan sel midgut ( $C \pm SD$ ) *S. litura* selama masa inkubasi ( $\times 10^9$ )

Perlakuan	Lama inkubasi (jam)						
	24	48	72	96	120	144	168
Grace's	$2,33 \pm 0,73^c$	$2,06 \pm 0,18^c$	$5,51 \pm 1,20^b$	$6,89 \pm 0,97$	$9,25 \pm 0,19^b$	$8,97 \pm 3,12$	$8,71 \pm 1,55^b$
Dulbeccos	$1,57 \pm 0,29^b$	$2,06 \pm 0,37^b$	$2,09 \pm 0,14^a$	$2,51 \pm 0,30$	$4,16 \pm 0,52^a$	$3,96 \pm 0,79$	$3,94 \pm 0,91^a$
RPMI 1640	$1,27 \pm 0,00^a$	$1,40 \pm 0,07^a$	$1,78 \pm 0,09^a$	$4,39 \pm 2,62$	$4,69 \pm 2,31^a$	$4,49 \pm 0,10$	$4,26 \pm 0,71^a$
Dulbeccos dan RPMI	$1,33 \pm 0,20^b$	$2,42 \pm 0,23^d$	$4,29 \pm 0,81^b$	$4,72 \pm 0,22$	$8,78 \pm 2,02^b$	$5,35 \pm 1,06$	$4,94 \pm 0,44^a$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda.



**Gambar 1.** Pertumbuhan sel midgut *S. litura* terhadap lama inkubasi

## PEMBAHASAN

Pertumbuhan sel di dalam suatu kultur akan mengikuti suatu fase, pada umumnya terdapat 4 fase dalam pertumbuhan sel yaitu *Lag phase*, *Log phase*, *Stationary phase*, *Death phase* (Ma'at, 2011). *Lag phase* pada sel midgut *S. litura* tidak tampak karena pertumbuhan yang cepat hal ini terlihat dari data Tabel 1 yang menunjukkan bahwa pertambahan sel midgut *S. litura* dalam waktu inkubasi 24 jam inkubasi mencapai 317 kali sampai dengan 5825 kali inokulum  $4,0 \times 10^5$ . *Lag phase* pada sel Sf9 juga tidak terlihat pada inkubasi 24-48 jam dalam media Ex-cell karena pertumbuhan yang cepat (Lenk *et al.*, 2006). *Lag phase* tidak terlihat pada media Grace's, Dulbeccos. dan media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos karena inokulum yang tinggi dan viabilitas yang bagus didukung oleh media yang memenuhi syarat tumbuh sel midgut *S. litura* (Butler, 2004; Ma'at, 2001).

*Log phase* ditunjukkan oleh grafik pertumbuhan (Gambar 1) pada masa inkubasi 24, 48, 72, 96, dan 120 jam pada media Grace's, Dulbeccos. dan media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos. Media RPMI 1640 menunjukkan *log phase* pada masa inkubasi 48, 72, 96, dan 120 jam. Adanya *Log phase* menunjukkan bahwa syarat-syarat media kultur untuk pertumbuhan sel midgut telah terpenuhi (Ma'at, 2011). RPMI 1640 memiliki pertambahan jumlah sel paling sedikit pada masa inkubasi 24 jam karena memiliki pH yang paling tinggi yaitu 6 dibandingkan dengan Grace's (kontrol) yang mempunyai pH 4, sehingga sel midgut *S. litura* memerlukan adaptasi yang lebih lama (Echalier, 1996). Perbedaan pengaruh antara media juga disebabkan oleh perbedaan komposisi maupun jumlah komponen-komponen yang ada pada masing-masing media (Mather dan Roberts, 1998). Media DMEM memiliki konsentrasi asam amino 2-4 kali lebih tinggi dari media RPMI 1640 (Mather dan Roberts, 1998). Media RPMI 1640 memiliki variasi jumlah asam amino yang hampir sama dengan Grace's, tetapi konsentrasi asam amino Grace's 2-20 kali lebih besar dibanding media RPMI 1640 (Mather dan Roberts, 1998). Pertambahan jumlah sel midgut pada masa inkubasi 48 jam antara 3.500 kali sampai dengan 7.150 inokulum awal. Pertambahan jumlah sel midgut *S. litura* pada masa inkubasi 72 jam yaitu 4.450 kali sampai dengan 13.775 inokulum awal. Pertambahan jumlah sel midgut *S. litura* pada masa inkubasi 96 jam, yaitu 6.275 kali sampai dengan 17.225 kali inokulum awal. Masa inkubasi 120 jam merupakan puncak dari pertumbuhan sel midgut *S. litura* (Gambar 1). Pertambahan jumlah

sel midgut *S. litura* mencapai 10.400 kali sampai dengan 23.125 kali inokulum awal. Media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos menunjukkan kemampuan yang sama dengan media Grace's yang ditunjukkan oleh uji BNT pada puncak pertumbuhan sel midgut *S. litura*, yaitu pada masa inkubasi 120 jam. Perbedaan komponen media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos dengan media Grace's terletak pada adanya unsur besi, vitamin berupa niacin dan B<sub>12</sub>, asam amino yaitu alanin, asam organik berupa asam fumarat, asam alfa ketoglutarat, dan asam suksinat, sukrosa, D-fruktosa, laktalbulmin hidrosilat dan yeastolat. Kebutuhan unsur *trace element* seperti besi pada media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos dapat dipenuhi dengan penambahan FBS sebanyak 10% ke dalam media kultur (Zhanqiu dan Hai-Rong, 2012). Vitamin Niacin dan B<sub>12</sub> pada media kultur sel insekta merupakan vitamin yang non esensial bagi pertumbuhan sel insekta (Echalier, 1996). Asam amino seperti  $\beta$  alanin, alanin, asam glutamat, asam aspartat dan asam organik dapat dihilangkan dari media kultur (Echalier, 1996). Sumber energi dalam media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos tersedia dalam bentuk glukosa karena paling mudah diabsorpsi oleh sel. Sukrosa dalam media Grace's tidak digunakan oleh sel selama hari pertama subkultur tetapi digunakan saat jumlah glukosa dan fruktosa habis (Echalier, 1996). Laktalbulmin hidrolisat merupakan sumber asam amino yang berasal dari susu sedangkan yeastolat berasal dari ekstrak yeast yang merupakan sumber vitamin, lipid, *trace element*, dan nukleotida. Laktalbulmin dan yeastolat dapat diganti dengan penambahan FBS sebanyak 10% ke dalam media kultur. Pencampuran media RPMI 1640 dan Dulbecos menambah komponen-komponen asam amino seperti asparagin, prolin, aspartat, dan asam glutamat. Penghilangan asam amino asparagin dan prolin pada media pertumbuhan sel akan mengurangi proliferasi sel (Echalier, 1996).

*Death phase* terjadi pada masa inkubasi 144 jam dan 168 jam pada media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos. *Stationary phase* pada grafik pertumbuhan sel midgut tidak terlihat pada media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos karena sumber energi pada media telah habis karena jumlah sel yang membelah tidak dapat mengimbangi jumlah sel yang mati (Ikonomou *et al.*, 2001). Sel midgut *S. litura* pada masa inkubasi 168 jam pada media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos terus menunjukkan *death phase*. Media Grace's, RPMI 1640, dan Dulbeccos menunjukkan *stationary phase* pada masa inkubasi 144 dan 168

jam. *Stationary phase* terlihat pada media Grace's, RPMI 1640, dan Dulbeccos karena sumber energi pada media berkurang (Ikonomou *et al.*, 2001). Ada dua mekanisme kematian sel di dalam suatu kultur yaitu apoptosis dan nekrosis (Butler, 2004). Apoptosis atau kematian sel terprogram yaitu proses fisiologis normal dari kematian sel yang diikuti dengan pecahnya inti dan membran sel (Hakim *et al.*, 2011). Apoptosis dimulai dengan berkurangnya nutrisi di dalam media kultur (Butler, 2004). Mekanisme kedua kematian sel yaitu nekrosis yang terjadi ketika sel secara tiba-tiba mengalami stres berat yang didahului dengan terlukanya sel. Nekrosis ditandai dengan pecahnya membran plasma yang menyebabkan sel membesar dan akhirnya pecah (Butler, 2004).

### SIMPULAN

Peningkatan jumlah sel midgut *Spodoptera litura* pada media Grace's sebesar 23.125 kali inokulum awal, media campuran Dulbeccos dan RPMI 1640 sebesar 21.950 kali inokulum awal, media RPMI 1640 sebesar 11.725 kali inokulum awal, media Dulbeccos sebesar 10.400 kali inokulum awal pada masa inkubasi 120 jam. Monolayer terbentuk pada masa inkubasi 24 jam pada media Grace's, Dulbeccos, dan media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos, sedangkan monolayer pada media RPMI 1640 terbentuk pada masa inkubasi 48 jam. Media campuran RPMI 1640 dan Dulbeccos merupakan media alternatif yang paling optimal dalam mendukung pertumbuhan sel midgut *S. litura*.

### DAFTAR PUSTAKA

Asri MT, Ducha N, & Pancawidyana D, 2007. *Upaya Perbanyakkan Spodoptera litura Multipel Nucleopolyhedrosis Virus (SINPV) sebagai bioinsektisida Secara In Vitro dengan Teknik*

*Kultur Sel Insekta*. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.

Butler M, 2004. *Animal Cell Culture and Technology*. New York: Taylor and Francis Group

Echalier G, 1997. *Drosophila Cell in Culture*. New York: Academic Press

Goosen MFA, Daugulis AJ, & Faulkner, 1993. *Insect Cell Culture Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Hakim RS, Baldwin K, & Smugghe G, 2010. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. *The Annual Review of Entomology*, 55:593-608

Ikonomou L, Bastin G, Schneider YJ, & Agathos SN, 2001. Design of an Efficient for insect Cell Growth and Recombinant Protein Production. *Journal of In Vitro Cell. Dev. Biol*, 37:549-559

Lenk SE, Irish TW, & Etchberger KJ, 2006. *Ex-cell™ 420 Serum-Free Medium for the Growth of Spodopteran (Sf9 and Sf21) Insect Cell*. Australia: SAFC Biosciences Pty. Ltd.

Lynn DE, 2006. Lepidopteran Cell Liner after Long-term Culture in Alternative Media: Comparison of Growth Rates and Baculovirus Replication. *Journal of In Vitro Cell. Dev. Biol*, 42:149-152

Ma'at, Suprpto. 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Surabaya: Airlangga University Press

Mather JP, Roberts PE, 1998. *Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique*. New York: Plenum Press

Vlak, J.M, Gooijer CD de, Tramper J, & Miltenburger HG, 1996. *Insect Cell Culture Fundamental and Applied Aspect*. USA: Kluwer Academic Publishers

Zhanqiu Y, & Hai-Rong X, 2012. *Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells*. Wuhan: Wuhan University